

**(54) PREPARATION OF CREATININEAMIDOHYDROLASE**

- (11) 56-39781 (A) (43) 15.4.1981 (19) JP  
 (21) Appl. No. 54-116369 (22) 11.9.1979  
 (71) KOBAYASHI SEIYAKU K.K. (72) ICHIROU KOBAYASHI  
 (51) Int. Cl<sup>3</sup>. C12N9/80//C12N9/80,C12R1/05

**PURPOSE:** To prepare creatinineamidohydrolase, by cultivating a microorganism belonging to the genus *Alkaligenes*.

**CONSTITUTION:** A strain, e.g., one FERM-P 5071, capable of producing creatinineamidohydrolase, belonging to the genus *Alkaligenes*, is inoculated on a medium and cultivated aerobically to prepare creatinineamidohydrolase in a culture solution, which is collected.

**(54) STABILIZATION OF THROMBIN**

- (11) 56-39782 (A) (43) 15.4.1981 (19) JP  
 (21) Appl. No. 54-112454 (22) 4.9.1979  
 (71) DAIICHI KAGAKU YAKUHIN K.K. (72) KAZUO SUGA(3)  
 (51) Int. Cl<sup>3</sup>. C12N9/96//A61K37/48

**PURPOSE:** To stabilize a thrombin solution, by adding a monofunctional or polyfunctional water-soluble organic carboxylate.

**CONSTITUTION:** An aqueous solution with a weak alkalinity usually in pH 7~9 is prepared from one or a combination of two or more of monofunctional or polyfunctional water-soluble organic carboxylates, e.g., sodium acetate, sodium citrate, sodium potassium tartrate, etc., and the solution is added to a thrombin solution.

**(54) FIXED PROTEASE AND ITS PREPARATION**

- (11) 56-39783 (A) (43) 15.4.1981 (19) JP  
 (21) Appl. No. 54-113196 (22) 3.9.1979  
 (71) KANEBO K.K. (72) HIROSHI NAKAYAMA(2)  
 (51) Int. Cl<sup>3</sup>. C12N11/04

**PURPOSE:** To prepare a fixed protease having improved stability, especially thermal stability, pH stability, and stability with time, by adding an acidic protease to fibroin.

**CONSTITUTION:** An aqueous solution of fibroin having a fibroin concentration 2~20wt% is blended with an aqueous solution of acidic protease having a pH 8~11 and a protease concentration 0.5~30wt% at a solution temperature of 0~15°C to give a mixed solution, which is adjusted to pH 8~11, preferably 8.5~10.5, and fibroin and protease are precipitated through salting out by using an inorganic salt and/or organic salt, e.g., ammonium sulfate, sodium citrate, etc. to prepare precipitate. The precipitate is washed with water with pH 8~11 and dried at not higher than 60°C at normal pressure or under reduced pressure to give a fixed protease containing 0.1~20wt%, preferably 1~15wt% acidic protease in a powdered fibroin.

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 56-039782

(43)Date of publication of application : 15.04.1981

(51)Int.Cl.

C12N 9/96  
// A61K 37/48

(21)Application number : 54-112454

(71)Applicant : DAI ICHI PURE CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 04.09.1979

(72)Inventor : SUGA KAZUO  
MAKI AKEMICHI  
HIBINO MITSUGI  
YOKOJIMA TETSUYOSHI

## (54) STABILIZATION OF THROMBIN

## (57)Abstract:

PURPOSE: To stabilize a thrombin solution, by adding a monofunctional or polyfunctional water-soluble organic carboxylate.

CONSTITUTION: An aqueous solution with a weak alkalinity usually in pH 7W9 is prepared from one or a combination of two or more of monofunctional or polyfunctional water-soluble organic carboxylates, e.g., sodium acetate, sodium citrate, sodium potassium tartrate, etc., and the solution is added to a thrombin solution.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—39782

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 9/96  
// A 61 K 37/48

識別記号

庁内整理番号  
7421—4B  
6617—4C

⑭ 公開 昭和56年(1981)4月15日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑮ トロンビンの安定化方法

⑯ 特 願 昭54—112454

⑰ 出 願 昭54(1979)9月4日

⑱ 発 明 者 須賀和男

東京都墨田区業平5丁目5番12  
号第一化学薬品株式会社東京研  
究所内

⑲ 発 明 者 牧明道

東京都墨田区業平5丁目5番12  
号第一化学薬品株式会社東京研  
究所内

⑳ 発 明 者 日比野貢

東京都中央区日本橋3丁目13番  
5号第一化学薬品株式会社内

㉑ 発 明 者 横島徹熹

東京都墨田区業平5丁目5番12  
号第一化学薬品株式会社東京研  
究所内

㉒ 出 願 人 第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋三丁目13番  
5号

㉓ 代 理 人 里見和幸

明 細 書

1. 発明の名称

トロンビンの安定化方法

2. 特許請求の範囲

一価あるいは多価の水溶性有機カルボン酸塩類から選ばれた化合物の一種類または二種類以上を組合せて添加することを特徴とするトロンビン溶液の安定化方法

3. 発明の詳細な説明

本発明はトロンビン溶液の安定化方法に関するものである。

さらに詳細には一価あるいは多価の水溶性有機カルボン酸塩類から選ばれた化合物の一種類または二種類以上を組合せて添加することを特徴とするトロンビン溶液の安定化方法を提供するものである。

トロンビンはフィブリノーゲンに作用して、フィブリンを生成することによつて血液凝固作用を生じるので外科領域において局所止血剤として使用されている薬剤である。またアンチト

ロンビンあるいはプロトロンビンの測定に広く使われる重要な酵素であり、これらの測定は血栓症、各種炎症及び肝障害の診断に有効なものである。

しかし、トロンビンは溶液状態においては非常に不安定であるため通常凍結乾燥品として保存し、用時溶解して直ちに使用する必要がある。

(John W. Fenton, David L. Aronson 等, J. Biol. Chem., 252巻, 5587頁, 1977年)

そのため特に臨床検査においては使用に際し少量ずつ溶解調製し且つ低温に保存したり、あるいはアルブミンを添加して安定性の増加をはかつたりしているが、いずれも満足し得るものではなく、いわんや最近の臨床検査における自動分析機用試薬の如く事前に調整された試液を分析機にセットして連続長時間分析する場合に、その間にトロンビン力価の低下はまぬがれず、全く使用し難いものである。そこで本発明者らはこれら欠点を克服すべくトロンビン溶液の安定化方法について鋭意研究を重ねた結果、

一価あるいは多価の水溶性有機カルボン酸塩類の添加がその安定化に非常に有効であることを見出し、本発明を完成した。

本発明に使用できる安定化剤としては一価あるいは多価カルボン酸、即ち酢酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、修酸、マロン酸、コハク酸等、一価あるいは多価のハイドロオキシカルボン酸即ち乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、グルクロン酸、グルコン酸、グリコール酸等の塩類が有効であるが、通常入手容易な塩類例えばクエン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム・カリウム、グルコン酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、コハク酸カリウム等を選択してその一種類あるいは二種類以上を適宜組合せて使用することができる。なお選択された塩類の水溶液は弱アルカリ性が好ましく、多くの場合はpH 7~9であるからそのまま使用できるが、pH 7~9を著るしくはずれる場合はあらかじめ水酸化ナトリウムあるいは塩酸で調整する必要がある。

- 3 -

ことができる方法であり、公知のアルブミン添加トロンビンと本発明の安定化剤添加トロンビンについて安定性を比較した結果を表-1及び表-2に示す。

表-1 37℃におけるヒトトロンビン溶液の安定性試験結果

安定化剤	時間	調製時	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間
0.1%牛アルブミン	100%	61%	27%	25%	20%	18%	
25%クエン酸ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	100%	98%	100%	98%	98%	99%	
25%カリウム・H <sub>2</sub> O	100%	98%	98%	101%	102%	99%	
25%酒石酸ナトリウム・カリウム・4H <sub>2</sub> O	100%	100%	100%	101%	101%	103%	
25%カリウム・4H <sub>2</sub> O	100%	100%	101%	99%	101%	100%	
25%グルコン酸ナトリウム	100%	100%	104%	100%	98%	102%	
25%カリウム	100%	99%	96%	93%	90%	87%	
25%リンゴ酸ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	100%	99%	99%	99%	99%	103%	
25%酢酸ナトリウム・3H <sub>2</sub> O	100%	99%	98%	98%	97%	99%	
25%コハク酸カリウム・3H <sub>2</sub> O	100%	99%	97%	98%	98%	98%	

(トロンビン活性: 0.625 U/ml)

- 5 -

本発明を実施するに当つては上記の如く選択された有機カルボン酸塩類をトロンビンの溶解用液にあらかじめ添加しておくか、トロンビンの溶解と同時に添加された状態になるように凍結乾燥トロンビンにあらかじめ混合しておいてもよい。

なお、安定化剤の使用量は調製されるトロンビン溶液に対し1%以上必要で、5%以上あれば充分である。即ちトロンビン溶解液中の安定化剤の濃度としては1~30%の範囲が好ましい。30%以上の濃度でもトロンビンは安定であるが、診断用試薬として用いる場合、塩濃度が高くなるため反応を阻害する恐れが生じ好ましくない。一方1%以下の場合には安定化剤の効果が少く実用的でない。

なお、本発明はヒト、牛、馬等の哺乳動物の血漿より得られる種々の品質のトロンビン溶液の安定化に適用可能である。

以上の様に本発明は簡単な操作で各種哺乳動物由来のトロンビン溶液の安定化を達成させる

- 4 -

表-2 37℃における牛トロンビン溶液の安定性試験結果

安定化剤	時間	調製時	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間
0.1%牛アルブミン	100%	95%	89%	80%	74%	67%	
25%クエン酸ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	100%	102%	102%	102%	98%	98%	
25%カリウム・H <sub>2</sub> O	100%	101%	98%	99%	99%	100%	
25%酒石酸ナトリウム・カリウム・4H <sub>2</sub> O	100%	102%	99%	98%	99%	99%	
25%カリウム・4H <sub>2</sub> O	100%	99%	98%	100%	99%	99%	
25%グルコン酸ナトリウム	100%	100%	100%	102%	98%	97%	
25%カリウム	100%	100%	99%	98%	97%	97%	
25%リンゴ酸ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	100%	100%	101%	101%	99%	100%	
25%酢酸ナトリウム・3H <sub>2</sub> O	100%	102%	101%	99%	99%	98%	
25%コハク酸カリウム・3H <sub>2</sub> O	100%	100%	100%	101%	99%	100%	

(トロンビン活性: 0.50 U/ml)

表-1及び2は調製時のトロンビン活性を100%としてその経時変化を示したものであり、本発明の安定化剤の添加により完全に経時変化が防止されている。

以上の如く本発明は有機カルボン酸塩類の添

- 6 -

加によりトロンビン溶液の安定化を達成させる方法であり、特に臨床検査用トロンビン溶液の安定化による自動分析機用トロンビン試薬溶液の実用化を可能にした有用な発明である。

次に実施例をもつて詳細に説明する。

#### 実施例 1

クエン酸ナトリウム ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 12.5 g を秤量し、500 ml のメスフラスコに秤量したクエン酸ナトリウムを移し、標線まで蒸留水を加え混合して完全に溶解する。次にヒトトロンビン (凍結乾燥品、250 単位/バイアル、シグマ社製) 1 バイアルを先に調整したクエン酸ナトリウム溶液 400 ml を用いて完全に溶解しトロンビン溶液を調製する。(トロンビン活性: 0.625 U/ml) このトロンビン溶液を 37℃ の恒温槽に静置させ、経時的にトロンビン活性を次の様にして測定した。

#### A 試薬の調製

##### a 緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタ

- 7 -

(凍結乾燥品、50 単位/バイアル、オーソ社製) 1 バイアルを先に調整した酒石酸カリウム溶液 80 ml を用いて完全に溶解しトロンビン溶液を調製する。(トロンビン活性: 0.625 単位/ml) このトロンビン溶液を 37℃ の恒温槽に静置させ、実施例 1 と同様に経時的にトロンビン活性を測定する。

#### 実施例 3

クエン酸ナトリウム ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 7.5 g を秤量し、300 ml のメスフラスコに秤量したクエン酸ナトリウムを移し、標線まで蒸留水を加えて混合し完全に溶解する。次にヒトトロンビン (凍結乾燥品、5000 単位/バイアル、パークデービス社製) 1 バイアルを先に調整したクエン酸ナトリウム溶液 100 ml を用いて完全に溶解し、一次トロンビン希釈液を調製する(トロンビン活性: 50 単位/ml)。ついで一次トロンビン希釈液 1 ml を 100 ml のメスフラスコにとり、調整したクエン酸ナトリウム溶液を標線まで加えて希釈する(トロンビン活性:

- 9 -

特開昭56- 39782(3)

ン 6.1 g, EDTA  $2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.8 g, 塩化ナトリウム 14.6 g を適当量の蒸留水で溶解させた後、稀塩酸で pH 8.4 に調整する。次に本溶解液を 1000 ml のメスフラスコに移し、標線まで蒸留水を加える。

#### b 基質液

トロンビン測定用合成基質 (S-2238, テストチーム<sup>®</sup>, 第一化学薬品株式会社発売) 25 mg を蒸留水 140 ml で溶解し、基質液とする。

#### B トロンビン活性の測定

緩衝液 350  $\mu\text{L}$ , トロンビン溶液 200  $\mu\text{L}$  及び基質液 300  $\mu\text{L}$  を加え、ただちにギルフォード 500 T 分光光度計にて波長 405 nm における吸光度変化 ( $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ ) を測定する。

#### 実施例 2

酒石酸カリウム ( $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ ) 2.5 g を秤量し、100 ml のメスフラスコに秤量した酒石酸カリウムを移し、標線まで蒸留水を加え、混合して完全に溶解する。次にヒトトロンビン

- 8 -

0.5 単位/ml)。このトロンビン溶液 (0.5 単位/ml) を 37℃ の恒温槽に静置させ、経時的にトロンビン活性を実施例 1 と同様に測定する。

#### 実施例 4

安定化トロンビン試液を用い自動分析機による血漿中アンチトロンビン活性の測定

#### A 試薬の調製

##### a 緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 6.1 g, EDTA  $2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.8 g, 塩化ナトリウム 14.6 g を適当量の蒸留水で溶解させた後、稀塩酸で pH 8.4 に調整する。次に本溶解液にヘパリン溶液 (10000 単位/10 ml/バイアル、扶桑薬品社製) 3 ml を加えた後、1000 ml のメスフラスコに移し標線まで蒸留水を加える。

#### b 基質液

トロンビン測定用合成基質 (S-2238, 第一化学薬品株式会社発売) 25 mg を蒸留水 140 ml で溶解し、基質液とする。

- 10 -

安定化ヒトトロニン試液の調整

ヒトトロニン (50単位/バイアル、  
オーソ社製) 1バイアルを5%酒石酸カリ  
ウムナトリウム ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 溶液  
80mlを用いて完全に溶解し、トロニン  
試液とする (トロニン活性: 0.625単  
位/ml)。

正常血漿の標準希釈系列 (標準液)

正常血漿 (テストチーム<sup>®</sup> アンチトロ  
ニンキット, 第一化学薬品株式会社発売)  
のを100%として、25%から125%  
までの希釈系列を作成する。

日立706自動分析機による測定法

日立706自動分析機に前記緩衝液、基質  
液および安定化トロニン試液をセットし、  
自動分析機の作動が安定したのち第1図に示  
す作動ダイヤグラムによつて34検体を連続  
分析した。

相関性の測定

第1図の日立706自動分析機のダイヤグ

- 11 -

キットで測定した値でそれぞれ正常血漿に対す  
る相対アンチトロニン活性量を%で示した。

特開昭56- 39782(4)

ラムに基づき波長415nm~505nmの二  
波長における吸光度変化量を自動測定すると  
ともに現在市販されている用手法キット (テ  
ストチーム<sup>®</sup> アンチトロニンキット, 第一  
化学薬品株式会社発売) でも測定を行ない比  
較した。34検体を使用し両法でアンチトロ  
ニン活性の測定を実施したところ、用手法  
キットとの相関係数は0.972と良好であ  
つた。用手法キットとの相関図は第2図に示  
した。

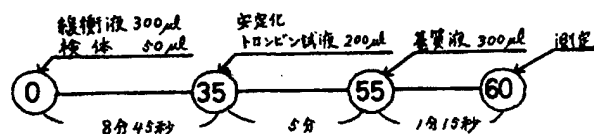
4図面の簡単な説明

第1図は日立706型自動分析機の作動ダイ  
アグラムであり、試薬の添加量、検体の添加量  
とその添加順序 (○内の数字の順でそれぞれ移  
動ベルト上の位置を示すものである。) 及びそ  
の時間間隔を示したものである。

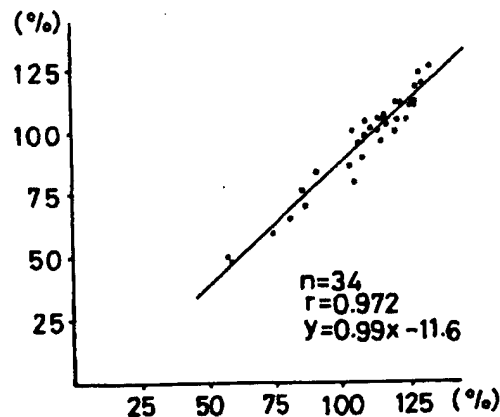
第2図は日立706型自動分析機と市販キッ  
ト (テストチーム<sup>®</sup>) を用いて測定したアンチ  
トロニン活性の相関図である。縦軸は日立  
706型自動分析機で測定した値、横軸は市販

- 12 -

第1図



第2図



- 13 -